

りんごジュースのパツリン汚染実態調査

Investigation of Patulin Contamination in Apple Juices

青柳 光敏 久保亜希子 新山 和人

Mitsutoshi AOYAGI, Akiko KUBO and Kazuhito NIYAMA

Key words : patulin (パツリン) ; apple juice (りんごジュース) ; Hokkaido (北海道)

パツリンは、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属等の真菌によって産生されるカビ毒（マイコトキシン）であり、毒性として、マウス、ラット等に対する LD_{50} は 5～170 mg/kg と報告されている¹⁾。一般にパツリン汚染の可能性が高い食品として、りんごジュースが知られており、平成15年11月には、りんごジュース及び原料りんご果汁にかかわるパツリンの規格基準（0.050 μ g/g）が設定された²⁾。

最近の実態調査から市販りんごジュース及び果汁におけるパツリン汚染が確認されており³⁾、また、腐敗等のため廃棄された国産りんご果実からもパツリンの検出が報告されている⁴⁾。

このような状況から、北海道でもりんごジュース等でパツリン汚染の危険性が考えられるが、これまでに道内において実態調査をした報告はない。そこで、道内産100%りんごジュース及び市販100%りんごジュースのパツリン汚染実態調査を行った。

方 法

1. 試 料

道内産100%りんごジュース（道内産りんごを原料とし、道内で製造されたもの）20試料は、生産者から直接購入した。市販100%りんごジュース（原料りんごの産地は不明で製造者または販売者が本州企業のもの及び外国原産のもの）12試料は、札幌市内の小売店で購入した。

2. 試薬及び標準品

アセトニトリル及び蒸留水は LC/MS 用、酢酸エチル及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用、その他の試薬は特級を使用した。

酢酸水は、蒸留水100 mL に酢酸を加え、pH 4 に調整して使用した。

パツリンは林純薬工業(株)製マイコトキシン試験用標準品を用いた。パツリン標準品2.5 mg を精秤し、酢酸エチル

に溶解して100 μ g/mL としたものを標準原液とした。これを窒素気流下で乾固した後、酢酸水に溶解し、2 μ g/mL としたものを添加回収試験用標準溶液とした。また、添加回収試験用標準溶液を適宜酢酸水で希釈して検量線用標準溶液とした。パツリン- $^{13}C_3$ は林純薬工業(株)製安定同位元素標識標準溶液（100 μ g/mL 酢酸エチル溶液）を用いた。パツリン- $^{13}C_3$ 標準溶液0.1 mL を窒素気流下で乾固した後、酢酸水に溶解し、0.1 μ g/mL としたものを内部標準溶液とした。

3. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ（LC）：（株）島津製作所製 Prominence シリーズを用い、カラムは Waters 社製 Atlantis dC18 (2.1×150 mm, 3 μ m) を使用した。移動相は A 液に 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液にアセトニトリルを用い、A : B = 96 : 4 のイソクラティック条件とした。質量分析装置（MS/MS）：Applied Biosystems 社製 API 4000 Q TRAP を使用した。イオン化はエレクトロスプレー（ESI）によるネガティブモードで行い、イオンスプレー電圧は -4.5 kV、イオン源温度は 600°C に設定した。パツリン及びパツリン- $^{13}C_3$ の測定条件は表 1 に示した。

4. 定 量

検量線用標準溶液及び試験溶液10 μ L を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムの内部標準であるパツリン- $^{13}C_3$ に対するパツリンのピーク面積比を求めて内部標準法により行った。

5. 試験溶液の調製法

赤木らの方法⁵⁾を一部変更して試験溶液を調製した。

試料（果肉を含む試料は、あらかじめ遠心分離（3,000 rpm, 10分間）を行い、その上清のみを用いた）10.0 g を 50 mL 共栓付遠沈管に採り、内部標準溶液1.0 mL を添加した。酢酸エチル20 mL で2回振とう抽出（5分間）した後、

表1 パツリン及びパツリン-¹³C₃のMRM分析パラメータ

化合物名	モニターイオン 1				モニターイオン 2			
	プレカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP(V)	CE(eV)	プレカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	DP(V)	CE(eV)
パツリン	153	109	-12	-7	153	81	-12	-7
パツリン- ¹³ C ₃	156	111	-16	-1	156	82	-16	-1

DP : Declustering potential, CE : Collision energy

表2 りんごジュース中のパツリン含量

	試料数	検出試料数	定量値 (μg/g)
道内産100%りんごジュース	20	0	
市販100%りんごジュース	12	4	0.003, 0.003, 0.008, 0.024

検出限界 : 0.002 μg/g

抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に酢酸水2.0 mLを加え溶解した後、0.45 μmのフィルターでろ過したものを試験溶液とした。なお、酢酸エチルによる抽出時に混濁した場合は、遠心分離(3,000 rpm, 10分間)し、酢酸エチル層を分取した。

6. 添加回収試験

試料10.0 gに添加回収試験用標準溶液1.0 mLを添加し(添加濃度0.2 μg/g)、30分後に前項に従って抽出を開始した。無添加1試料及び添加3試料について行った。

結果及び考察

パツリン及びパツリン-¹³C₃のLC及びMS条件は、赤木らの報告⁵⁾に従ったところ、良好な分析が可能であった。また、検量線は0.01~10 μg/mLの範囲で良好な直線性が得られ($r^2=0.999$)、定量限界値は0.002 μg/g($S/N=10$)と規格基準(0.050 μg/g)に対し、十分な検出感度を得られた。

試験溶液の調製についても赤木らの方法⁵⁾に準じた。ただし、この方法では、試料を分液ロートに採り、酢酸エチル80 mLで1回振とう抽出しているが、混濁した場合は遠心分離機を用いて酢酸エチル層と水層を分離していたことから、今回は共栓付遠沈管に試料を採り、酢酸エチル20 mLで2回振とう抽出することとした。本法を用いて、パツリンを含まないことを確認したりんごジュースにパツリンを0.2 μg/g添加して添加回収試験($n=3$)を行った。内部標準法により求めたパツリンの回収率は99.0±0.2%、変動係数は0.2%と良好であった。一方、内部標準パツリン-¹³C₃の回収を絶対検量線法により求めたところ91.7±2.5%、

変動係数2.7%であった。

道内産100%りんごジュース20試料及び市販100%りんごジュース12試料について、パツリン汚染実態調査を行い、その結果を表2に示した。道内産100%りんごジュースでは、すべての試料でパツリンは検出されなかった。一方、市販100%りんごジュースでは、12試料中4試料からパツリンが0.003~0.024 μg/g検出された。

今回の実態調査からは基準値を超えるパツリンは検出されず、食品衛生法上問題がなかった。しかし、基準値の約1/2の濃度のパツリンが検出された試料も存在した。パツリンの汚染防止として、りんご果実生産者には、傷果発生防止のための丁寧な収穫・出荷、選別段階における腐敗果の選別等の徹底、また、りんご果実の加工業者には、果実保管時の温湿度管理、果実の洗浄、腐敗果の除去等の徹底が求められている³⁾。パツリンに汚染されたりんごジュースの流通を防止するため、これら生産管理の徹底とともに、モニタリングによる監視の継続が必要であると考ええる。

文 献

- 1) 田端節子：食品衛生研究, 55(11), 29-35 (2005)
- 2) 厚生労働省告示第369号「食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件」, 平成15年11月26日
- 3) 農林水産省生産局プレリリース「薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格・毒性合同部会におけるりんご果汁に係るかび毒(パツリン)に関する検討結果を踏まえた農林水産省の対応について」, 平成14年12月25日
- 4) 田端節子, 飯田憲司, 鈴木 仁, 木村圭介, 斉藤和夫, 須崎浩一, 兼松聡子, 伊藤 伝：日本食品衛生学会第88回学術講演会要旨集, 34 (2004)
- 5) 赤木浩一, 畑野和広：福岡市保健環境研究所報, 29, 145-147 (2004)